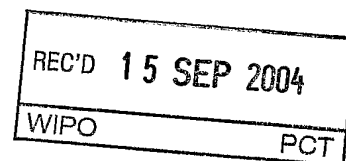




PCT/CN2004/000803

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本



申 请 日： 2004.01.16

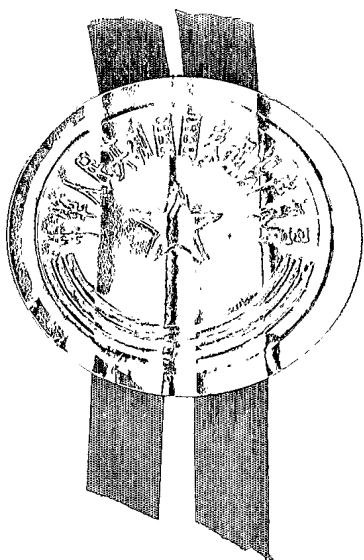
申 请 号： 2004100151690

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 干扰素脂质体乳膏

申 请 人： 深圳市海王英特龙生物技术股份有限公司

发明人或设计人： 王妍、柴向东、李云富、董保科、张雪涛



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 荣 川

2004 年 7 月 28 日

权 利 要 求 书

1. 干扰素脂质体乳膏，其特征在于干扰素脂质体与乳化剂等乳膏赋形剂组成。
2. 如权利要求 1 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于包含有干扰素脂质体和基质，在基质中采用聚山梨酯 80 作为乳化剂。
3. 如权利要求 2 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于如上所述的干扰素脂质体乳膏中的干扰素脂质体组份是：干扰素，大豆磷脂，胆固醇，VitE，硬脂酰胺。
4. 如权利要求 3 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于所述的干扰素脂质体乳膏含有干扰素为 0.1×10^4 — 5×10^8 IU/克；其中脂质体的质量组成为 65%~90%大豆磷脂，5%~30%胆固醇，0.2%~2%VitE，0.005%~0.05%硬脂酰胺；干扰素：脂质体为 10^8 — 10^{12} IU：100g。
5. 如权利要求 2 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于如上所述的干扰素脂质体乳膏的基质的组份是：白凡士林，甘油，单硬脂酸甘油酯，右旋糖酐 40，对羟基苯甲酸乙酯，聚山梨酯 80，乳酸乙酯。
6. 如权利要求 5 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于如上所述的干扰素脂质体乳膏的基质的组份是：5%~30%凡士林，10%~40%甘油，5%~35%单硬脂酸甘油酯，0.2%~20%右旋糖酐 40，0.01%~0.15%对羟基苯甲酸乙酯，0.5%~8%聚山梨酯 80，0.25%~2.5%乳酸乙酯。
7. 如权利要求 1 至 6 任一权利要求所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于干扰素脂质体乳膏的组份含量为：干扰素脂质体（生物活性）：基质=（ 5×10^3 IU~ 5×10^6 IU）：1g。作为优选项，干扰素脂质体：乳膏基质= 5×10^4 IU：1g 的比例。
8. 如权利要求 7 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于如上所述的干扰素脂质体乳膏的干扰素可以是天然的，基因重组的人干扰素，可以是 α 、 β 、 γ 三种的任一型别。
9. 如权利要求 1 至 6 任一权利要求所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于如上所述的干扰素脂质体乳膏的干扰素可以是天然的，基因重组的人干扰素，可以是 α 、 β 、 γ 三种的任一型别。
10. 如权利要求 8 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于如上所述的干扰素脂质体乳膏的干扰素优选为 α 2b 亚型。
11. 如权利要求 9 所述的干扰素脂质体乳膏，其特征在于如上所述的干扰素脂质体乳膏的干扰素优选为 α 2b 亚型。

说明书

干扰素脂质体乳膏

所属领域:

本发明属于干扰素制品领域。

现有技术:

干扰素作为抗病毒、抗增殖和免疫调节药物已广泛使用,采用的剂型主要是针剂和外用剂型。外用型的干扰素可以直接作用于病灶部位,使用方便。但在应用过程中发现需要解决干扰素的活性保持和透皮吸收的问题。为了保持干扰素生物学活性的稳定,并改善干扰素的透皮吸收,达到治疗目的,较好的方式就是采用脂质体将干扰素包封,再制备相应的外用剂型。但现有技术中,采用脂质体包封的干扰素存在着许多的不足。如国外文献仅报道有脂质体作为外用药物载体包封干扰素,但干扰素脂质体用药后与皮肤或粘膜不能牢固结合而发挥疗效,大大降低了干扰素的治疗指数。又如中国专利号 97109122.6 号发明专利提供了一种含有碘伏和脂质体的预防性药物,由于采用了碘伏,对于干扰素的本身具有破坏性,同时因其具有高氧化性对脂质体也将有破坏作用,从而降低干扰素的生物学活性,影响干扰素的疗效。此外,中国专利号 97109123.4 号发明专利,提供了一种干扰素脂质体凝胶剂,其采用凝胶与干扰素脂质体组合,使干扰素在脱水后成为粉状,使用前需先在水中全部溶解后成为凝胶水溶液,再作为外涂药物使用。同时,该种干扰素脂质体凝胶在制备时需将赋形剂与干扰素脂质体在 0-4℃ 相混合,干燥后成为微粒粉状的干扰素脂质体凝胶剂。该发明的凝胶剂具有以下不足:1、制备工艺复杂,需要经过冻干过程,此过程将降低干扰素的活性;2、要将凝胶剂用水溶解后才能作为外涂药物使用,使用不方便。

发明内容

本发明的目的在于提供一种干扰素脂质体乳膏产品,它具有包封率高,且制剂工艺稳定,粒子均一性好,药效稳定,易于均匀的涂敷于皮肤粘膜,粘附性好,且无刺激性,容易被皮肤吸收,使用方便的优点。

本发明采用干扰素脂质体与乳化剂等赋形剂组成的基质制备成乳膏剂型,提高了干扰素脂质体稳定性以及干扰素活性和药效,同时具有制备简单,使用方便

的优点。

本发明的干扰素脂质体乳膏，包含有干扰素脂质体和基质，在基质中采用聚山梨酯 80 作为乳化剂。由于聚山梨酯 80 对干扰素脂质体不但没有破坏作用，反而对脂质体有稳定作用，即可减少脂质体中干扰素的泄露，提高干扰素脂质体的稳定性，从而提高干扰素的药效。

如上所述的干扰素脂质体乳膏的干扰素脂质体组份是：干扰素，大豆磷脂，胆固醇，VitE，硬脂酰胺。

如上所述的每克干扰素脂质体乳膏中干扰素的含量为： $0.1 \times 10^4\% \sim 5 \times 10^8 \text{IU}$ 。脂质体的组分为 65%~90%大豆磷脂，5%~30%胆固醇，0.2%~2%VitE，0.005%~0.05%硬脂酰胺。干扰素：脂质体液为 $10^6 \sim 10^8 \text{IU} : 1\text{ml}$ (脂质体的包封率不小于 80%)。

如上所述的干扰素脂质体乳膏的基质的组份是：白凡士林，甘油，单硬脂酸甘油酯，右旋糖酐 40，对羟基苯甲酸乙酯，聚山梨酯 80，乳酸乙酯。

如上所述的干扰素脂质体乳膏的基质的组份是：5%~30%白凡士林，10%~40%甘油，5%~35%单硬脂酸甘油酯，0.2%~20%右旋糖酐 40，0.01%~0.15%对羟基苯甲酸乙酯，0.5%~8%聚山梨酯 80，0.25%~2.5%乳酸乙酯。

干扰素脂质体乳膏的组份含量为：干扰素脂质体(生物活性)：基质= $(5 \times 10^3 \text{IU} \sim 5 \times 10^6 \text{IU}) : 1\text{g}$ 。作为优选项，干扰素脂质体：乳膏基质= $5 \times 10^4 \text{IU} : 1\text{g}$ 的比例。

如上所述的干扰素脂质体乳膏的干扰素可以是天然的，基因重组的人干扰素，可以是 α β γ 三种的任一型别。

如上所述的干扰素脂质体乳膏的干扰素优选为 $\alpha 2b$ 亚型。由于干扰素 $\alpha 2b$ 具有比活性高，抗病毒作用强，中和抗体产生率低的优点，再经脂质体包封，使得干扰素不仅活性稳定，而且透皮吸收好，治疗靶向性强，同时作用持久、对干扰素有控释与缓释作用。使用重组人干扰素 $\alpha 2b$ 脂质体乳膏可治疗由病毒感染引起的皮肤病，如带状疱疹、疱疹性口炎、疣、尖锐湿疣、染性软疣、外生殖器疱疹、扁平疣、寻常疣、生殖器溃疡、口疮及瘙痒等。同时，本发明的乳膏具有易于均匀的涂敷于皮肤粘膜，粘着性好，且无刺激性，更易被皮肤吸收，使用方便的优点。

本发明脂质体包封的干扰素乳膏产品，它具有包封率高，且制剂工艺稳定，

7

制品均一性好，药效稳定，使用方便的优点。采用干扰素脂质体与乳化剂等赋形剂组成的基质制备成乳膏剂型，能够提高脂质体包封性，提高干扰素活性和药效，同时具有制备简单，使用方便的优点。在基质中采用聚山梨酯 80 作为乳化剂。由于聚山梨酯 80 对干扰素脂质体不但没有破坏作用，反而对脂质体有稳定作用，可减少脂质体中干扰素的泄露，提高干扰素脂质体的稳定性，提高干扰素的药效。具体实施例：

一、组方：

干扰素脂质体配方(每克)：

5×10^6 IU 干扰素；脂质体为大豆磷脂：胆固醇：硬脂酰胺：VitE = 80:18:1:1。
基质配方：甘油：单硬脂酸甘油酯：白凡士林：聚山梨酯 80：右旋糖酐 40：乳酸乙酯：对羟基苯甲酸乙酯 = 20:20:5:3:1:1:0.1。干扰素脂质体乳膏所含干扰素含量：
基质为 5×10^4 IU:1g

二、制备方法

(一)、干扰素脂质体的制备

1、干扰素原液的稀释，取干扰素原液，用含 0.8%人血白蛋白的 PBS 稀释至 250ml，使干扰素含量为 0.8×10^7 IU/ml，除菌过滤后备用。

2、旋转蒸发，用 CH_2Cl_2 分别将称量好的注射用大豆磷脂 9.2 克，胆固醇 1.03 克，溶解后，加入球型瓶中，再加入含 0.7%维生素 E 的 CH_2Cl_2 4.5ml 和含 0.008%硬脂酰胺的 CH_2Cl_2 8ml，40℃100rpm 旋转蒸发 30 小时，然后收集悬液 290ml。

3、超声处理，将收集的悬液 290ml 用浴式超声仪，超声分散。

4、凝胶过滤，将经过超声分散的干扰素脂质体液 280ml 通过 G25 柱过滤，洗脱液洗脱收集 800ml 干扰素脂质体液，

5、将过柱后的干扰素脂质体液体 800ml 经 0.22 μ 的滤膜除菌过滤，过滤收集 780ml。

(二)、基质的配制

1、油相 单硬脂甘油酯 4200 克
 白凡士林 1050 克
 聚山梨脂 80 630 克 混匀

2、水相 甘油 4200 克
右旋糖酐 40 210 克
对羟基苯甲酸乙脂 21 克
乳酸乙脂 210 克
蒸馏水 8400 克 混匀

3、将油相、水相分别融化，经过滤、灭菌后，将油相、水相混合制成基质。

(三)、乳膏制备

将干扰素脂质体加入到 18921 克的基质中，使干扰素的最终生物活性为 5×10^4 IU/克，并搅拌均匀后将其按 15 克/支进行分装。

三、药理及毒理性实验

(一) 药理学研究实验：

重组人干扰素 α 2b 脂质体乳膏 0.6×10^4 、 1.0×10^4 、 10.0×10^4 IU/只，每日分 2 次涂抹患处，连续 7 日，对豚鼠实验性单疱病毒性疱疹有明显抑制作用，且其强度随剂量增大而增强。

另实验证明，该乳膏 0.9×10^4 、 1.5×10^4 、 15.0×10^4 IU/只涂抹小鼠破损皮肤对其自主活动无明显影响；麻醉猫破损皮肤涂抹该乳膏 0.3×10^5 、 0.5×10^5 、 5.0×10^5 IU/只，对其血压、心率、呼吸频率、呼吸深度及心电图无明显影响。

(二)、毒理学研究实验：

1、大鼠急性毒性试验：重组人干扰素 α 2b 脂质体乳膏最大给药量 2.78×10^7 IU/kg，连续观察 7 天，7 天内大鼠无一死亡，亦未出现异常反应，该剂量相当于临床剂量的 1.1×10^4 倍，所以临床用药非常安全。

2、大鼠长期毒性试验：重组人干扰素 α 2b 脂质体乳膏按 2.5×10^6 IU/只剂量于大鼠破损皮肤处给药，每日一次，连续 28 天（相当于临床拟用周期的 4 倍）。结果与对照组比较，对所观察的各指标（活动、体重、饮食量、饮水量、血常规、血生化指标、脏器系数、组织病理学检查）均无明显异常。连续给药 28 天后再停药观察 14 天，上述各指标均无明显异常。

四、安全性检查实验：

(一)、皮肤过敏试验：重组人干扰素 α 2b 脂质体乳膏按 5.0×10^4 IU/g, 0.2g/次剂量，反复接触皮肤，未见红肿、坏死等过敏反应。

(二)、皮肤刺激性试验：重组人干扰素 α 2b 脂质体乳膏按 5.0×10^4 IU/g, 1.0g/次剂量，连续 7 日涂抹皮肤，对豚鼠完整皮肤和破损皮肤无刺激性反应。

五、对单纯疱疹病毒性疱疹实验

重组人干扰素 α 2b 脂质体乳膏按 0.6×10^4 、 1.0×10^4 、 10.0×10^4 IU/只，每日分 2 次涂抹已形成疱疹模型的豚鼠皮患处，连续 7 日。给药后 1-2 天，病情无明显差异。 1.0×10^4 IU/只组和 10.0×10^4 IU/只组给药后第 3 天开始， 0.6×10^4 IU/只组从第 4 天开始，病情恢复程度明显好于模型组。与阳性对照组阿昔洛韦软膏比较，抗单纯疱疹病毒作用更强。

六、聚山梨酯 80 对干扰素脂质体稳定性试验：

一、试验材料：

聚山梨酯 80：药用级，广东省肇庆市超能实业有限公司

干扰素脂质体原液：自制，干扰素活性为 6.2×10^6 IU/ml

PBS：磷酸盐缓冲液，浓度为 0.1M，pH 为 7.2

脂质体裂解剂：0.04% Triton X-100 的 PBS

722 型光栅分光光度计：上海第三分析仪器厂

倒置显微镜：型号：CK2，日本 OLYMPUS 公司

二、试验方法：

1. 用 PBS 将脂质体干扰素 60 倍稀释，使其活性为 1.0×10^5 IU/ml
2. 用 PBS 将聚山梨酯 80 稀释成浓度为 1%、2%、5%、10% 溶液
3. 取 6 只试管，分别加入稀释后的脂质体各 2ml，分别标 1~6 号备用
4. 1~4 号试管中分别加入稀释好的不同的聚山梨酯 80 溶液各 2ml，使聚山梨酯 80 的终浓度分别为 0.5%、1%、2.5%、5%
5. 5 号、6 号加入 PBS 和裂解液各 2ml 阴性和阳性对照，6 号管中 Triton X100 的终浓度为 0.02%
6. 各样品分别在 40℃ 水浴中作用 5 分钟，用 722 型光栅分光光度计测定 OD 值，测定波长为 600nm
7. 分别取部分 40℃ 水浴过的样品进行活性测定
8. 干扰素的生物学活性采用微量细胞病变抑制法

三、试验结果:

样品编号	聚山梨酯 80 终浓度 (%)	OD 值	生物学活性 (IU/ml)
1	0.5	0.210	1.98×10^4
2	1	0.208	1.18×10^4
3	2.5	0.203	0.65×10^4
4	5	0.212	0.69×10^4
5	阴性对照	0.211	1.76×10^4
6	阳性对照	0.012	4.05×10^4

五、结论:

从测得的 OD 值数据可以看出,加入不同浓度聚山梨酯 80 的脂质体溶液测定的 OD 值与阴性对照的 OD 值基本一致,说明聚山梨酯 80 没有使脂质体裂解。而阳性对照测定的 OD 值明显很低,说明终浓度为 0.02%TritonX-100 的 PBS 溶液可以使低浓度的脂质体裂解。

从活性的测定结果来看,随着聚山梨酯 80 浓度的提高,脂质体溶液中游离的干扰素活性降低,但含有 2.5%~5.0%的聚山梨酯 80 的脂质体溶液,其游离干扰素活性的变化不明显,说明聚山梨酯 80 对脂质体的保护浓度在 2.5%左右。

总之,不大于 5%的聚山梨酯 80 对脂质体不但没有破坏作用,反而对脂质体有稳定性作用,即减少了脂质体中干扰素的泄露。